

# 자외선분광기를 이용한 미생물 세포 생축매의 에폭사이드 가수분해효소 활성평가

김희숙 · 이은열<sup>†</sup>

경성대학교 식품공학과

(2005년 2월 2일 접수, 2005년 3월 31일 채택)

## UV Spectrometric Assay of Epoxide Hydrolase Activity of Microbial Cell Biocatalysts

Hee Sook Kim and Eun Yeol Lee<sup>†</sup>

Department of Food Science and Technology, Kyungshung University, Busan 608-736, Korea

(Received February 2, 2005; accepted March 31, 2005)

미생물 세포 유래의 에폭사이드 가수분해 효소 활성을 효율적으로 분석하기 위하여 UV 분광기 측정법을 최적화하였다. 세포 생축매의 에폭사이드 가수분해 활성에 의해 *p*-nitrostyrene oxide (pNSO) 기질이 *p*-nitrostyrene diol로 전환된 양을 측정함으로써 에폭사이드 가수분해 활성을 평가하였다. *Rhodospiridium toruloides*를 생축매로 사용하고 pNSO에 대한 입체선택적 가수분해 동력학을 UV 분광기 측정법으로 분석한 결과,  $K_m$ 과  $V_m$  값을 2.457 nmol/min·mg 및 1.078 mM로 각각 결정할 수 있었다.

UV spectrometric assay for measurement of epoxide hydrolase activity was tested for efficient screening of whole cell activity of epoxide hydrolase. Epoxide hydrolase activities were determined by measuring the amount of *p*-nitrostyrene diol (pNSD), which was the hydrolysis product of *p*-nitrostyrene oxide (pNSO). Enantioselective hydrolysis of racemic pNSO using epoxide hydrolase activity of *Rhodospiridium toruloides* was monitored by UV spectrometric assay, and the relevant  $K_m$  and  $V_m$  for *R. toruloides* were determined as 2.457 nmol/min·mg and 1.078 mM, respectively.

**Keywords:** epoxide hydrolase, *p*-nitrostyrene diol, *p*-nitrostyrene oxide, *Rhodospiridium toruloides*, spectrometric assay

### 1. 서 론

의약품을 포함한 많은 생리활성물질들은 여러 종류의 광학이성질체가 존재하며, 이들 중 특정 광학이성질체만이 올바른 활성을 보여주고 다른 이성질체는 경우에 따라 심각한 부작용을 유발하는 경우가 많다. 이와 같이 광학이성질체들의 생리활성 차이가 존재함에 따라 순수한 광학활성물질 합성에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 광학활성물질 합성에 사용될 수 있는 대표적인 합성 중간체인 광학활성 에폭사이드는 반응성이 우수하여 다양한 반응을 유도할 수 있다[1]. 입체선택적 가수분해 활성 차이를 가지는 에폭사이드 가수분해효소(epoxide hydrolase)를 이용하여 라세믹 에폭사이드 기질로부터 특정 이성질체만을 가수분해하여 제거함으로써 순수한 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있다[2]. 이 방법은 저가의 생축매를 사용하여 저가의 라세믹 기질로부터 고부가가치의 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있어 상업화 가능성이 높은 기술이다.

다양한 에폭사이드에 대한 입체선택적 가수분해 활성이 우수한 신규 에폭사이드 가수분해효소 선별은 상업화 연구에서 가장 중요한 분야이다. 유용한 특성을 가진 신규 에폭사이드 가수분해효소를 선별하기 위해서는 대용량의 미생물 후보군들로부터 효율적으로 에폭사이드

가수분해효소 활성을 측정할 수 있는 assay 방법 개발이 요구된다. 수용상의 반응액에 있는 남아있는 에폭사이드 기질을 유기용매로 추출한 다음 chiral column을 장착한 gas chromatography (GC)를 이용하여 분석하는 방법이 가장 널리 사용되고 있다[3]. 이 방법은 광학순도 및 생성물의 chirality를 정확하게 분석할 수 있다는 장점이 있지만, 정교한 분석기술과 긴 분석시간이 요구되기 때문에 대용량의 미생물 후보군들로부터 에폭사이드 가수분해효소 활성을 검색하기에는 효율적인 방법이 될 수 없다. GC 분석을 통한 활성 검색의 비효율성을 극복하기 위하여 UV/vis 분광기를 이용하는 방법들이 개발되었다[4-7]. 4-(*p*-Nitrobenzyl)pyridine의 alkylation 반응을 통한 색깔 변화를 측정하는 colorimetric assay의 경우 낮은 기질 전환율에서는 재현성이 문제가 될 정도로 assay 방법이 최적화되지 못하였다[4,7]. 또한, UV/vis 분광기를 이용한 에폭사이드 가수분해효소 활성 분석 연구에서 에폭사이드 가수분해효소 단백질을 분리정제하거나, 적어도 crude extract 수준의 효소 생축매를 제조하여야만 에폭사이드 가수분해효소 활성을 제대로 분석할 수 있었다[6,8]. 이러한 방법에서는 효소 제조 과정에 많은 시간과 노력이 요구되며, 분리공정 도중 활성 손실로 인한 정확한 활성 분석이 어렵다는 단점이 있다. 분리된 효소를 사용하지 않고, 미생물 세포를 생축매로 사용하여 에폭사이드 가수분해효소 활성을 직접 측정하는 경우에서 효소에 비해 비활성이 일반적으로 100배 이상 낮으므로 세포 생축매의 에폭사이드 가수분해효소 활성 자체가 낮아 측정

<sup>†</sup> 주 저자(e-mail: eylee@ks.ac.kr)

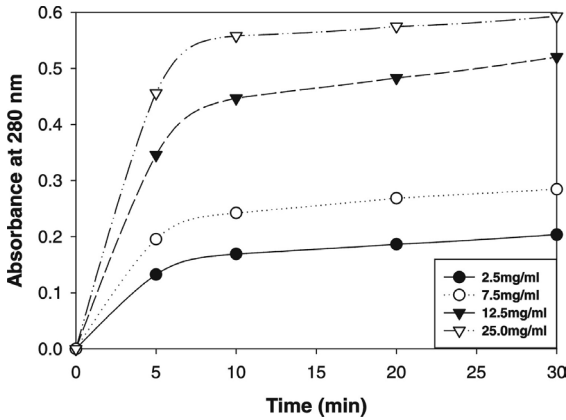


Figure 1. Effect of cell concentrations on absorbance at 280 nm during time-course of 1 mM *p*-nitrostyrene oxide hydrolysis by epoxide hydrolase activity of *R. toruloides* SJ-4.

에 있어서 오차가 발생할 수 있다는 문제점을 생각할 수 있다. 이러한 문제점은 molar extinction 계수가 높은 기질을 사용하여 민감도와 정확도를 높임으로써 해결할 수 있다. 본 연구에서는 기존의 GC 및 UV/vis 분광기를 이용한 에폭사이드 가수분해효소 활성 측정에 있어서의 문제점을 극복하고, 유용한 에폭사이드 가수분해효소를 가진 신규 미생물을 효율적으로 선별할 수 있는 screening 방법을 개발하기 위하여 미생물 세포 생축매 기반에서 UV 분광기를 이용한 에폭사이드 가수분해효소 활성 측정법을 최적화하였으며, *Rhodospiridium toruloides* SJ-4의 입체선택적 가수분해 동력학을 평가해 보았다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 미생물 균주 및 배양 조건

*R. toruloides* SJ-4를 배양하기 위한 배지로는 1% (w/v) yeast extract 및 1% (w/v) glucose를 포함하는 최소배지(Peptone 10 g/L, NaCl 2 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.147 g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.3 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.4 g/L)를 사용하였으며, 배양온도 27 °C, 250 rpm에서 48 h 진탕 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리 후 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)로 두 번 세척한 다음 생축매로 사용하였다.

### 2.2. 가수분해반응 산물인 *p*-nitrostyrene diol (pNSD)에 의한 280 nm에서의 흡광도 측정을 통한 epoxide hydrolase 활성 측정

에폭사이드 가수분해효소의 기질로 사용한 *p*-nitrostyrene oxide (pNSO)는  $\omega$ -bromo-*p*-nitroacetophenone으로부터 합성하여 사용하였으며 문헌에 제시되어 있는 방법에 따랐다[9]. *R. toruloides* SJ-4 세포를 2.5~25.0 mg/mL를 넣은 100 mM 인산완충용액에 pNSO의 최종농도가 0.1~5.0 mM이 되도록 적정량의 pNSO stock solution을 넣어 최종부피를 2 mL로 만들었다. 이때 1.0 mM 이상의 pNSO 농도를 얻기 위해서는 2~20% (v/v)의 DMF를 첨가한 다음 최종부피를 맞추었다. 30 °C shaking incubator에서 30~60 min간 가수분해반응을 실시하였으며 대조군 실험으로는 에폭사이드 가수분해효소 활성이 없는 미생물 세포를 같은 양을 넣고 반응을 실시하였다. 가수분해반응 종료 후 정확한 흡광도 측정을 위하여 원심분리(14000 rpm, 5 min)로 세포를 제거한 다음, 1 mL의 CHCl<sub>3</sub>을 넣고 30 sec 정도 vortexing하여 가수분해반응물에 있는 pNSO를 제거하였다. 수용액상에 남아있는 가수분해산물 pNSD의 농도를 알기 위하여 280 nm에서 흡광도를 측정하고 검광곡선을 이

용하여 정량하였다.

### 2.3. *R. toruloides* 세포 유래의 에폭사이드 가수분해효소 활성을 이용한 pNSO의 입체선택적 가수분해 반응

pNSO 라세믹 기질에 대한 입체선택적 가수분해 반응은 *R. toruloides* (7.5 mg/mL)와 3 mM의 라세믹 pNSO 기질을 10 mM 인산완충용액(pH 7.0)에 현탁시킨 다음, shaking incubator (30 °C, 250 rpm)에서 교반하면서 반응을 진행하였다. pNSO 가수분해 반응에 대한 GC 분석을 위하여 일정간격으로 얻은 샘플에 존재하는 에폭사이드를 cyclohexane으로 추출하고, 이 유기용매층을 chiral GC로 분석하여 광학순도(enantiomeric excess ( $ee = \frac{(S-R)}{(S+R)} \times 100(\%)$ ))와 수율 등을 결정하였다.

### 2.4. Chiral Gas Chromatography 분석

pNSO 정량분석을 위한 chiral GC 분석조건은 문헌 값을 이용하였다 [4]. 검출기로는 FID를, 그리고 분석용 column으로는 silica cyclodextrine capillary  $\beta$ -DEX 120 (30 m length, 0.25 mm ID, and 0.25  $\mu$ m film thickness; Supelco, USA)을 사용하였다. 이동가스로 질소를 사용하였으며 column, injector, 그리고 detector의 온도는 각각 100, 220, 220 °C이었다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 자외선 분광기를 이용한 에폭사이드 가수분해효소 활성 측정 특성 분석

일반적으로 미생물에 존재하는 에폭사이드 가수분해효소는 구성 발현되는 효소로서 전체 단백질 대비 0.05~0.1% (w/w) 정도로 매우 적게 발현된다고 알려져 있다[7]. 따라서 UV 분광기를 이용하여 에폭사이드 가수분해효소 활성 측정법 개발에 있어 생축매로 효소를 분리·정제하여 사용하였다. 그러나 일반적으로 효소 분리 과정이 복잡하며, 분리된 효소가 분석 조건에 따라 활성이 심하게 저하될 수 있다는 단점이 있어 새로운 에폭사이드 가수분해효소 생축매 선별을 위한 탐색 방법으로는 적합하지 못하다. 산업적으로 유용한 신규 미생물 탐색 및 에폭사이드 가수분해효소 유전자 확보에 있어 세포 자체를 생축매로 사용하여 에폭사이드 가수분해효소 활성을 측정하는 것이 바람직하다. 그러나 세포 생축매의 활성이 효소 생축매보다 낮으므로 낮은 기질 전환율에서도 그 변화량을 손쉽게 측정하기 위해서는 특정 과정에서 높은 molar extinction 계수를 가진 기질을 사용하는 것이 필요하다. pNSO를 기질로 사용하여 에폭사이드 가수분해효소로 가수분해시키는 경우 반응산물로 pNSD가 생성된다. pNSD는 280 nm에서 molar extinction 계수가 7420/M · cm로 높아 낮은 기질 전환율에서도 비교적 손쉽게 그 변화량을 측정할 수 있으므로 본 연구에서 미생물 세포 생축매 유래의 에폭사이드 가수분해효소 활성을 평가에 사용하기로 하였다. 이 방법에서는 가수분해 반응액에 있는 잔여 pNSO를 chloroform 등의 유기용매를 써서 제거하고, 반응전과 반응후의 pNSD 농도증가를 280 nm에서 측정하여 그 차이를 정량하여 에폭사이드 가수분해효소 활성을 측정하는 방법이다.

에폭사이드 가수분해효소 활성을 이용한 pNSO의 가수분해반응에서 기질인 pNSO는 수용액상에서의 용해도가 낮아 pNSO 농도를 높이기 위해서는 유기용매를 사용해야 하며, 본 실험에서는 생축매 활성을 비교적 적게 저해하는 DMF 2~20% (v/v)를 유기용매로 사용하였다 [7,10]. pNSD에 의한 흡광도 변화 측정을 효과적으로 하기 위해 사용해야 할 최적의 세포양을 결정하기 위하여, 1 mM의 pNSO 기질에 대

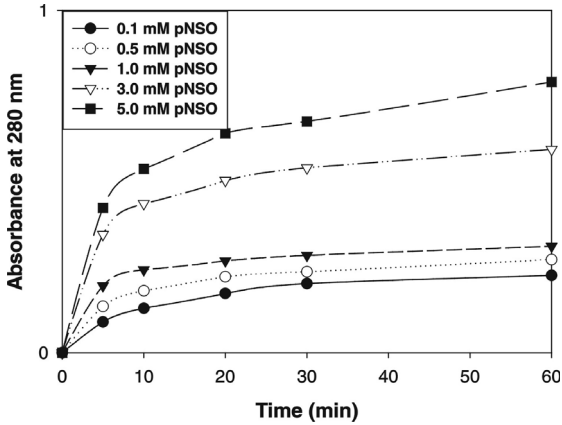


Figure 2. Effect of *p*-nitrostyrene oxide substrate concentrations on absorbance at 280 nm during time-course of *p*-nitrostyrene oxide hydrolysis by epoxide hydrolase activity of *R. toruloides* SJ-4.

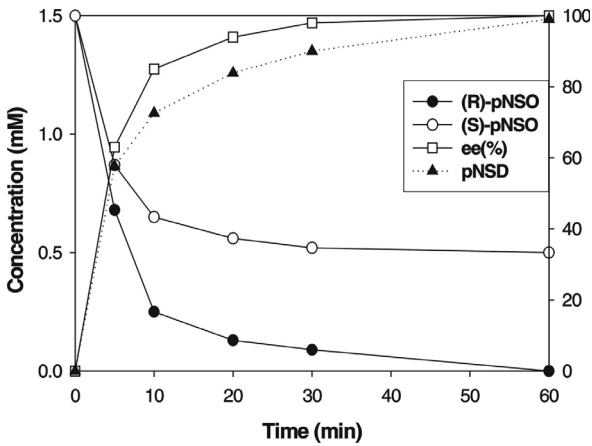


Figure 3. Enantioselective hydrolysis of 3 mM racemic *p*-nitrostyrene oxide by epoxide hydrolase activity of *R. toruloides* SJ-4 in 10 mM phosphate buffer.

하여 *R. toruloides* 세포양을 2.5~25.0 mg/mL 수준으로 변화시키면서 흡광도 변화량을 측정하였다(Figure 1). 첨가한 세포양이 많을수록 전체 에폭사이드 가수분해효소 활성이 증가하기 때문에 흡광도 변화량도 비례적으로 증가하였다. *R. toruloides* 세포를 2.5 mg/mL로 사용한 경우에서도 초기 5 min간의 반응에서 0.1 이상의 흡광도 증가가 있어, pNSD에 의한 흡광도 측정을 통해 *R. toruloides* 세포 생축매의 활성을 쉽게 평가할 수 있었다. 7.5 mg/mL의 세포를 사용한 경우, 흡광도 변화를 큰 오차 없이 쉽게 측정할 수 있는 범위인 0.2 정도가 나와 최소 세포양으로 결정하였다.

pNSO 기질 농도 변화에 따른 흡광도 변화를 측정하였다. Figure 2에서와 같이 pNSO 농도를 0.1~5.0 mM로 변화시키기에 따라 가수분해반응 생성물인 pNSD에 의한 흡광도도 비례적으로 증가하였다. 흡광도 증가량을 높이기 위해서는 5.0 mM 수준의 pNSO를 사용하는 것이 좋았으나, 이 경우 용해도 문제를 해결하기 위하여 20% (v/v)의 DMF를 사용해야하므로 세포 생축매 활성 저하를 유발시킬 수 있다. 세포 및 효소 생축매 활성에 큰 영향을 주지 않는 10% (v/v) 아래의 DMF를 첨가할 때 녹일 수 있는 기질 농도인 1.0 mM 이하의 pNSO 기질 사용이 바람직한 것으로 판단되었다.

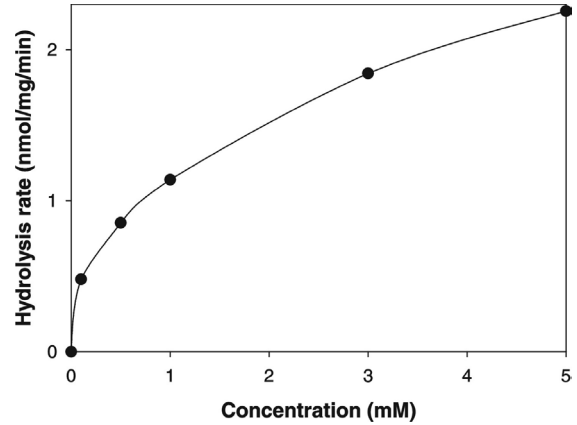


Figure 4. Kinetics of hydrolysis of *p*-nitrostyrene oxide by epoxide hydrolase activity of *R. toruloides* SJ-4 for estimation of relevant Michaelis-Menten constants.

3.2. 자외선 분광기를 이용한 에폭사이드 가수분해효소 활성 측정법 평가 및 *R. toruloides*의 pNSO 가수분해 동력학 분석

자외선 분광기를 이용한 미생물 세포 유래의 에폭사이드 가수분해 효소 활성 측정결과를 평가하기 위하여 기존에 가장 많이 사용되는 chiral GC 분석결과와 비교하였다. 초기 pNSO 기질농도 3 mM에 대하여 7.5 mg/mL의 *R. toruloides* 세포 생축매를 첨가하고, 30 °C, 250 rpm에서 교반하면서 입체선택적 가수분해를 실시하였다. 일정간격으로 얻은 샘플에 남아 있는 (R)-, (S)-pNSO의 농도는 chiral GC로 분석하였고, 동시에 반응생성물인 pNSD의 농도는 자외선 흡광도 증가를 통해 측정하였다. Figure 3에서와 같이 약 60 min 정도의 반응을 통해 ee 값이 100%인 광학적으로 순수한 (S)-pNSO를 33%(이론수율 = 50%)의 수율로 얻을 수 있었다. 반응시간에 따라 분해되고 남은 pNSO의 양과 생성되는 pNSD의 양이 서로 보완적인 모습을 보여주어, chiral GC 분석 결과와 자외선 분광기를 이용한 반응 모니터링 결과가 일치함을 알 수 있었다.

자외선 분광기를 이용하여 *R. toruloides*에 의한 라세믹 pNSO의 가수분해 반응 동력학을 분석하고, 관련 매개변수를 측정하였다. Figure 4에서와 같이 0.1~5.0 mM 농도의 pNSO 기질에 대하여 초기 5 min간의 가수분해 속도를 pNSD에 의한 흡광도 증가를 통해 측정하였고, 검량곡선을 이용하여 정량화하였다. 라세믹 pNSO에 대한 동력학적으로 Michaelis-Menten식을 사용하는 경우, 라세믹 pNSO 기질에 대한 V<sub>m</sub>과 K<sub>m</sub> 값을 각각 2.457 nmol/min · mg, 1.078 mM로 결정할 수 있었다. 따라서 280 nm에서 molar extinction 계수가 높아 낮은 기질 전환율에서도 그 변화량을 자외선 분광기로 손쉽게 측정할 수 있는 pNSD를 이용하면 미생물 세포 생축매 유래의 에폭사이드 가수분해효소 활성에 대한 동력학적 분석이 가능하며, 여러 종류의 미생물 생축매에 대한 손쉬운 활성 평가를 통해 상업화용 생축매 선별 방법으로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

4. 결 론

광학활성 의약품 합성에 널리 사용되는 고부가가치 유기 중간체인 광학활성 에폭사이드의 상업화를 위해서는 다양한 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해 촉매활성이 우수한 에폭사이드 가수분해효소를 가지는 신규 미생물 확보가 매우 중요하다. 이러한 신규 미생물들을 효율적으로 screening하기 위하여 UV spectrometer를 이용한 미생

## 참고 문헌

물 세포 생육매 기반의 에폭사이드 가수분해효소 활성 측정법을 평가하였다. 에폭사이드 가수분해효소 활성에 의해 기질인 pNSO가 가수분해되어 pNSD의 생성이 증가하면, 이에 따른 흡광도 증가를 측정하여 미생물 세포 기반에서도 에폭사이드 가수분해효소 활성을 손쉽게 측정할 수 있었다. 이 방법은 기존의 GC 분석법보다 분석시간이 짧으며, 별도로 효소를 분리하지 않고 세포 자체에 대해 직접 에폭사이드 가수분해효소 활성을 측정할 수 있어 유용한 에폭사이드 가수분해효소를 가진 신규 미생물을 효율적으로 선별하는데 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

1. N. Kasai, T. Suzuki, and Y. Furukawa, *J. Mol. Cat. B: Enz.*, **4**, 237 (1998).
2. E. J. de Vries and D. B. Janssen, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 414 (2003).
3. J. H. Lee and E. Y. Lee, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **15**, 150 (2004).
4. F. Zocher, M. M. Enzelberger, U. T. Bornscheuer, B. Hauer, and R. D. Schmid, *Anal. Chim. Acta*, **391**, 345 (1999).
5. C. Mateo, A. Archelas, and R. Furstoss, *Anal. Biochem.*, **314**, 135 (2003).
6. K. Dodere, S. Lutz-Wahl, B. Hauer, and R. D. Schmid, *Anal. Biochem.*, **321**, 131 (2003).
7. T. Bhatnagar, K. M. Manoj, and C. Baratti, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **50**, 1 (2001).
8. E. Y. Lee, S.-S. Yoo, H. S. Kim, S. J. Lee, Y.-K. Oh, and S. Park, *Enzym. Microbial Technol.*, **35**, 624 (2004).
9. R. B. Westkaemper and R. P. Hanzlik, *Anal. Biochem.*, **102**, 63 (1980).
10. W. J. Choi, E. Y. Lee, S. J. Yoon, and C. Y. Choi, *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 339 (1999).